



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr
Certification of patent application no

1999 6335

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23

► *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23*

2003.07.17

Freddy Strømmen

Freddy Strømmen
Seksjonsleder

Line Reum

Line Reum



PATENTSTYRET®

Styret for det industrielle rettsvern

lc

PATENTSTYRET

20.DES99 996335

20 DES. 1999

EK/KBN

17.12.99

E10512

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow
Fløensbakken 41A
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

Metoder for sekvensanalyse

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttet/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.

Foreliggende oppfinnelse omhandler bruk av DNA-chips til parallele sekvenseringsreaksjoner, til bruk ved sekvensanalyse ; i kombinasjon med utrettingsmetoder av DNA.

Bruk av DNA chips til parallelle sekvensreaksjoner

Potensialet i de ovenstående sekvenseringsmetodene kan økes ytterligere ved å kjøre mange parallelle sekvensreaksjoner på samme avlesningsplate. En strategi er å bruke DNA chips som er bygd opp med DNA sekvenser som komplementerer starten på de DNA sekvensene som ønskes sekvensert (fig. 1). Ved hjelp av denne strategien kan man f.eks. feste gener fra en person ved å bruke fragmentert genomisk DNA. Dermed kan man plukke ut et stort antall gener som er av medisinsk diagnostisk interesse og sekvensere disse parallelt. Et viktig poeng er at man ikke er nødt til å utføre konvensjonelle PCR reaksjoner i forkant av selve festeprosedyren

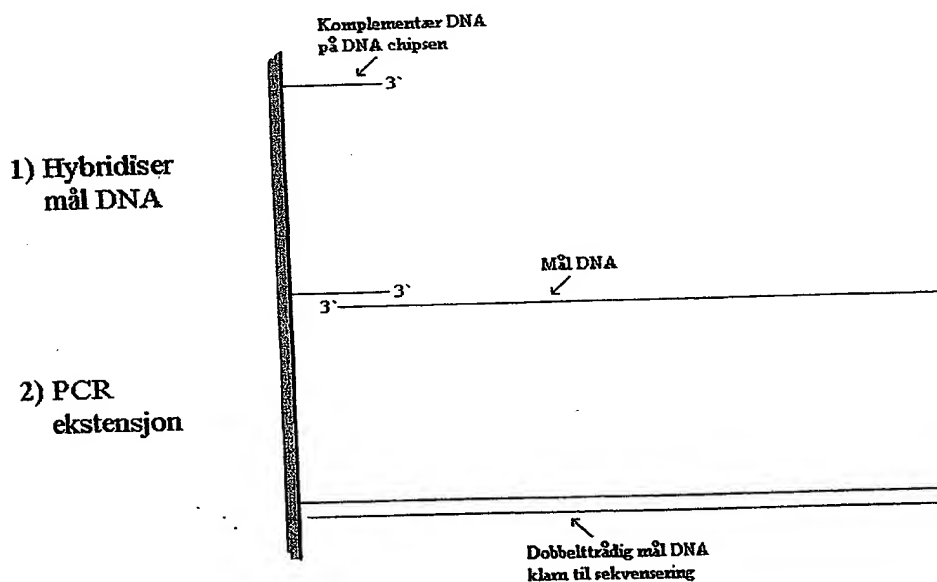


Fig 1. Metode for å feste mål DNA til en DNA chips. Utgangspunktet er en DNA chips med oligonukleotider som er komplementære med mål DNA'en. Enkeltrådig mål DNA kan dermed hybridiseres til DNA chipsen. Dertter ekstenderer man DNA molekyl en PCR syklus slik at man får dobbeltrådig mål DNA klar til sekvensering.

Metoder for å rette ut DNA

Metoder for å rette ut DNA har blitt utviklet i flere ulike sammenhenger. For å finne en bedre metode til å lokalisere fluorescerende DNA-prober brukte Weier et al en teknikk kalt «molecular combing»; En løsning med mål-DNA som probene ble hybridisert til ble plassert på en flat glassoverflate preparert slik at DNA-molekylene festet seg med en av endene til glassplaten. Deretter fikk de DNA-molekylene til å rette seg ut ved hjelp av en væskestrøm. Ved hjelp av et fluorescens mikroskop kunne de dermed observere probenes relative posisjoner på de utstrakte DNA-molekylene (Weier HUG, et al.; Hum Mol Genet 4(10):1903-1910 (1995)). For å teste elastisiteten til DNA-molekyler lanserte Steven Chu i 1991 en metode kalt «laser trapping» hvor han «fanget» den enden av et DNA-molekyl med en laserstråle mens resten av molekylet ble rettet ut ved hjelp av en væskestrøm (Chu S; Science 253:861-6). Videre har Chu's og andres forsøk vist at DNA-molekyler har en betydelig elastisitet og selv DNA-molekyler på flere hundre kb kan tåle en slik utrettingsprosedyre (Strick-TR, et al.; Science 271:1835-7).

Som alternativ til eksisterende metoder for å rette ut DNA kan man bruke elektriske ladninger. Elektriske ladninger er lette å regulere i styrke, skaper homogene felter uten turbulens og virker umiddelbart. DNA molekyler er i utgangspunktet negativt ladede og vil således tiltrekkes av positive og frastøtes av negative ladninger. Som fig. 2 viser kan man således tenke seg en ulike strategier for å rette ut DNA ved hjelp av elektriske ladninger.

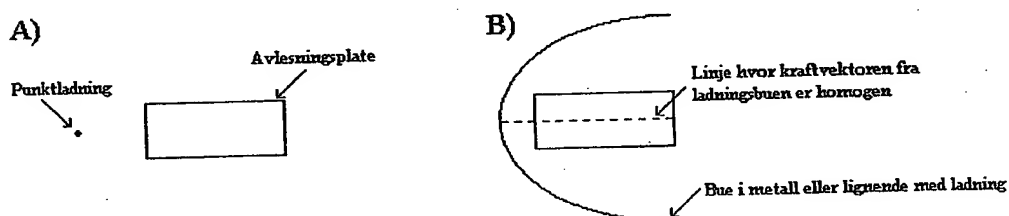


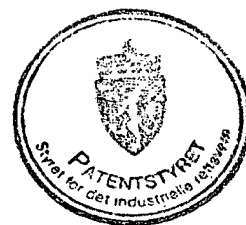
Fig 2. Metoder for å rette ut DNA molekyler ved hjelp av elektriske ladninger. A) Det prinsipielt enkleste er å plassere en positiv eller negativ punktladning foran avlesningsplaten. I følge Coulombs lov er ladningens kraft på DNA molekylene invers proporsjonal med avstanden². DNA molekylene nærmest ladningen vil dermed strekkes med større kraft enn de som er lenger unna. For at alle DNA molekylene skal være likt påvirket i avlesningsøyeblikket er man derfor nødt til å bevege punktladningen i takt med avlesningsenheten. I tillegg kan man plassere punktladningen langt unna avlesningsplaten slik at kraftdifferansen på platen blir redusert. B) Som alternativ er det mulig å arrangere ladningen i en bue slik at kraftvektorene blir like store i en rett linje midt inne i buen. Dermed behøver man kun å forflytte ladningen når avlesningsenheten forflyttes sidelengs.



P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for sekvensanalyse, k a r a k t e r i s e r t v e d
beskrivelsen.



Sammendrag

O. nr. E10512

Fremgangsmåte for anvendelse av DNA-chips og metoder for utretting av DNA for bruk ved sekvensanalyse.

